



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 31 776.3

Anmeldetag: 13. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
Mannheim/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Scanmikroskopie und Scanmikroskop

IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

Hiebinger

Verfahren zur Scanmikroskopie und Scanmikroskop

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Scanmikroskopie.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Scanmikroskop mit einer Lichtquelle, die Beleuchtungslicht zur Beleuchtung einer Probe emittiert, die zumindest einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, mit einer Scaneinrichtung zum Abrastern von Rasterpunkten der Probe, mit einem Spektraldetektor zum Detektieren des
10 von den Rasterpunkten ausgehenden Detektionslichtes, wobei der Spektraldetektor für jeden Rasterpunkt Spektraldaten erzeugt.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren
15 Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt
20 kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitenrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine
5 Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlableitenrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden,
10 hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme
15 erzielt, wobei die Bahn des Abtastlichtstrahles auf bzw. in dem Objekt idealerweise einen Mäander beschreibt. (Abtasten einer Zeile in x-Richtung bei konstanter y-Position, anschließend x-Abtastung anhalten und per y-Verstellung auf die nächste abzutastende Zeile schwenken und dann, bei konstanter y-Position, diese Zeile in negativer x-Richtung abtasten u.s.w.). Um
20 eine schichtweise Bilddatennahme zu ermöglichen, wird der Probentisch oder das Objektiv nach dem Abtasten einer Schicht verschoben und so die nächste abzutastende Schicht in die Fokusebene des Objektivs gebracht.

Bei vielen Anwendungen werden Proben mit mehreren Markern, beispielsweise mehreren unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen präpariert.
25 Diese Farbstoffe können sequentiell, beispielsweise mit Beleuchtungslichtstrahlen, die unterschiedliche Anregungswellenlängen aufweisen, angeregt werden. Auch eine simultane Anregung mit einem Beleuchtungslichtstrahl, der Licht mehrerer Anregungswellenlängen beinhaltet, ist üblich. Aus der Europäischen Patentanmeldung EP 0 495 930:
30 „Konfokales Mikroskopsystem für Mehrfarbenfluoreszenz“ ist beispielsweise eine Anordnung mit einem einzelnen mehrere Laserlinien emittierenden Laser

bekannt. Derzeit sind in der Praxis solche Laser meist als Mischgaslaser, insbesondere als ArKr-Laser, ausgebildet.

Zur Detektion werden hierbei Spektraldetektoren verwendet, die beispielsweise als Multibanddetektoren ausgeführt sein können, wie sie
5 beispielsweise die Deutsche Offenlegungsschrift DE 198 03 151.3 A1 offenbart.

Aus der Deutschen Offenlegungsschrift DE 198 29 944: A1 ist ein Verfahren und eine Anordnung zur Gerätekonfiguration von konfokalen Mikroskopen bekannt, bei denen Laserlicht mit einer oder mehreren Spektrallinien erzeugt
10 und auf eine Probe gerichtet wird, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthält oder auf einen Fluoreszenzfarbstoff aufgebracht ist. Dabei werden die Excitationswellenlängen und die Emissionswellenlängen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in getrennten Datensätzen erfasst und diese in einem Datenspeicher abgelegt. Ebenso werden die mit dem Mikroskop einstellbaren
15 Laserspektren, die auf die Probe zu richten sind, und die mit den vorhandenen Filtern erzielbaren Transmissionsspektren in Datensätzen erfasst und diese Datensätze gespeichert. Aus einer rechnerischen Verknüpfung dieser Datensätze werden Vorgaben für die Konfiguration des Mikroskops ermittelt.

Derzeit werden die von dem Spektraldetektor gemessenen Spektraldaten über
20 einen Datenbus an die weiterverarbeitenden Module bzw. Rechner oder PCs übertragen. Dies ist online möglich, wenn die Anzahl der gleichzeitig abgetasteten Rasterpunkte klein ist. Derzeit ist typischerweise bei 10 MB pro Übertragungskanal und pro Sekunde die maximale Bandbreite des Datenbusses ausgeschöpft. Sind die Spektraldaten sehr umfangreich und
25 werden gleichzeitig viele Rasterpunkte abgetastet, wie es beispielsweise bei Zeilenscannern oder bei Nipkovsystemen üblich ist, so reicht die Bandbreite für eine Onlineübertragung nicht mehr aus, so dass ein Onlinedarstellung der Probe nicht möglich ist, ohne Informationen zu verlieren.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur
30 Scanmikroskopie vorzuschlagen, das zuverlässig und mit minimalem

Informationsverlust eine Online-Beobachtung einer Probe auch dann ermöglicht, wenn simultan große Mengen an Spektraldaten anfallen.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- 5
 - Beleuchten einer Probe, die zumindest einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, mit Beleuchtungslicht,
 - Detektieren des von Rasterpunkten der Probe ausgehenden Detektionslichtes mit einem Spektraldetektor, der für jeden Rasterpunkt Spektraldaten erzeugt,
- 10
 - Ermitteln eines Amplitudenwertes zu jedem Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten und
 - Übertragen der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul.

Es ist außerdem eine Aufgabe der Erfindung ein Scanmikroskop anzugeben, mit dem zuverlässig eine Online-Beobachtung einer Probe auch dann möglich
15 ist, wenn simultan große Mengen an Spektraldaten anfallen.

Diese Aufgabe wird durch ein Scanmikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Modul zum Ermitteln eines Amplitudenwertes für jeden Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten vorgesehen ist, und dass Mittel zum Übertragen der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul
20 vorgesehen sind.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass das „Nadelöhr“ der prinzipiell limitierten Übertragungsrate von dem Scankopf eines Scanmikroskops zu dem Verarbeitungsmodul, das aus den gewonnenen Detektionssignalen und Spektraldaten dem Benutzer anzeigbare Bilddaten erzeugt und das meist als
25 vom Scankopf räumlich getrennter PC ausgeführt ist, erfindungsgemäß nicht mehr der limitierende Faktor bei der Online-Beobachtung einer Probe ist; selbst wenn beispielsweise simultan ganze Scanzeilen mit vielen, beispielsweise 1024, Rasterpunkten abgetastet werden.

Dies wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, dass möglichst früh in der Datenkette eine Datenreduktion erreicht wird, die jedoch nicht mit einem
30

Verlust an Informationen einher geht. In einer bevorzugten Ausgestaltung wird die Datenreduktion, nämlich das Ermitteln eines Amplitudenwertes zu jedem Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten, bereits in einem Modul innerhalb der Elektronik des Scankopfes vollzogen. Vorzugsweise ist dieses Modul in

5 Form einer programmierbaren Elektronik, wie beispielsweise FPGA (Field Programmable Gate Array) oder DSP (digital signal processor) umfasst, implementiert.

In einer bevorzugten Ausgestaltung umfasst der Spektraldetektor ein Gitter- oder Prismenspektrometer oder vorzugsweise einen Multibanddetektor.

10 In einer bevorzugten Ausführung umfasst das Beleuchten ein Abrastern der Rasterpunkte der Probe mit Beleuchtungslicht, insbesondere mit dem Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles. Dieser kann beispielsweise mäanderförmig über oder durch die Probe geführt werden. Es ist auch möglich, die Probe

15 weiträumig - nicht abrasternd - zu beleuchten und die Zuordnung der Spektralinformationen zu Rasterpunkten durch rasterndes Detektieren vorzunehmen, was besonders gut mit konfokalen Anordnungen realisierbar ist.

In einer bevorzugten Ausgestaltung erfolgt das Abrastern sequentiell. In einer anderen Variante erfolgt das Abrastern zumindest teilweise simultan oder

20 zeilenweise.

Eine bevorzugte Ausführungsvariante des Verfahrens umfasst den weiteren Schritt des Ermitteln des zumindest einen in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs aus den Spektraldaten. Dies kann in einer bevorzugten Ausgestaltung ein Vergleichen der Spektraldaten mit in einem Speichermodul

25 für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe abgelegten Referenzdaten umfassen. Die Referenzdaten werden auf der Basis der bekannten Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe erstellt und in dem Speichermodul abgelegt. Die Referenzdaten können beispielsweise bei der Herstellung in dem Speichermodul abgelegt werden oder, je nach Anwendung, individuell vom

30 Benutzer oder automatisch in das Speichermodul geladen werden. Stehen für das Emissionsspektrum eines - beispielsweise exotischen -

Fluoreszenzfarbstoffes keine Referenzdaten zur Verfügung, so können diese Daten während der Messung ermittelt werden und für künftige Untersuchungen zu den Referenzdaten hinzu gefügt werden, so dass bei dem nächsten Auftreten von vergleichbaren Spektraldaten für ein Pixel nur noch
5 auf die Referenzdaten zugegriffen werden muss. Das Vergleichen der Spektraldaten mit den Referenzdaten umfasst vorzugsweise ein Minimieren der Summe der Fehlerquadrate.

In einer bevorzugten Variante umfasst das Verfahren nach der Übertragung den weiteren Schritt des Rekonstruierens der Spektraldaten in dem
10 Verarbeitungsmodul aus den übermittelten Amplitudenwerten. Dies ist durch einfache Rechenoperationen möglich, da dem Verarbeitungsmodul die Art der Datenreduktion auf der Basis der Referenzdaten und die Referenzdaten selbst bekannt sind.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung wird die Abweichung der
15 gemessenen Spektraldaten vom entsprechenden Referenzsignal als Zusatzinformation, aus der die Übereinstimmung bewertet werden kann, mit an das Verarbeitungsmodul übertragen. Die Zusatzinformation kann beispielsweise die Summe der Fehlerquadrate beinhalten.

Das Verfahren ist sowohl bei Mehrpunktscannern und Zeilenscannern, als
20 auch bei sehr schnellen Einpunktscannern insbesondere bei Dauerscans von Vorteil. Außerdem bei der Übertragung über Datennetze, wie beispielsweise das Internet.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltung ist das Scanmikroskop ein konfokales Scanmikroskop.

25 In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop und

Fig. 2 ein Flussdiagramm für das erfindungsgemäße Verfahren,

30 Fig. 1 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop, das als

konfokales Scanmikroskop ausgeführt ist. Der von einer Lichtquelle 1, die als Mehrlinienlaser 3 ausgeführt ist, kommende Beleuchtungslichtstrahl 5 wird mit Hilfe der Optik 9 auf die Beleuchtungslochblende 11 fokussiert. Nach Passieren der Beleuchtungslochblende 11 wird der Beleuchtungslichtstrahl 5 von einem Strahlteiler 13 über die Linse 7 zu einem kardanisch aufgehängten Scanspiegel 15, der den Beleuchtungslichtstrahl 5 durch die Scanoptik 17, die Tubusoptik 19 und das Objektiv 21 hindurch über bzw. durch die Probe 23 führt. Die Probe ist mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der Beleuchtungslichtstrahl 5 wird bei nicht transparenten Proben 23 über die Probenoberfläche geführt. Bei biologischen Proben 23 (Präparaten) oder transparenten Proben kann der Beleuchtungslichtstrahl 5 auch durch die Probe 23 geführt werden. Der von der Probe 23 ausgehende Detektionslichtstrahl 25 gelangt durch das Objektiv 21, die Tubusoptik 19 und die Scanoptik 17 hindurch und über den Scanspiegel 15 zum Strahlteiler 13, passiert diesen und trifft nach Passieren der Detektionsblende 27 auf einen Spektraldetektor 29, der als Multibanddetektor 31 ausgeführt ist und der elektrische Detektionssignale in Form von Spektraldaten erzeugt und an ein Modul 33 zum Ermitteln eines Amplitudenwertes weiterleitet. In dem Modul 33, das als FPGA-Baustein ausgeführt ist, erfolgt das automatische Ermitteln der in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe aus den Spektraldaten durch Vergleichen der Spektraldaten mit den in einem Speichermodul 35 für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe abgelegten Referenzdaten. Anschließend erfolgt das Ermitteln eines Amplitudenwertes bezüglich jedes ermittelten Fluoreszenzfarbstoffs auf der Basis der Spektraldaten. Die Amplitudenwerte werden zusammen mit Daten über die ermittelten Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe eines Datenbusses 37 an ein Verarbeitungsmodul 39, das als PC 41 ausgeführt ist, übertragen. Nach der Übertragung werden die Spektraldaten in dem Verarbeitungsmodul 39 aus den übermittelten Amplitudenwerten und den Daten über die ermittelten Fluoreszenzfarbstoffe rekonstruiert. Die grafisch aufbereiteten Ergebnisse werden dem Benutzer auf einem Monitor 43 angezeigt.

Fig. 2 zeigt in einem Flussdiagramm den Ablauf eines erfindungsgemäßen

- Verfahrens. In einem ersten Schritt erfolgt das Abrastern 45 von Rasterpunkten einer Probe mit Beleuchtungslicht, in einem weiteren Schritt erfolgt das Detektieren 47 des von den Rasterpunkten ausgehenden Detektionslichtes mit einem Spektraldetektor, der für jeden Rasterpunkt
- 5 Spektraldaten erzeugt. Der Spektraldetektor kann beispielsweise als Prismen-, Gitter oder Multibanddetektor ausgeführt sein. In einem dritten Schritt erfolgt das Ermitteln 49 eines Amplitudenwertes bezüglich jedes in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff, der dem Anteil des von diesem Fluoreszenzfarbstoff in einem Pixel ausgehenden Lichtes am
- 10 Gesamtdetektionslicht proportional ist, aus den Spektraldaten und anschließend das Übertragen 51 der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul. In einem letzten Schritt erfolgt das Rekonstruieren 53 der Spektraldaten in einem Verarbeitungsmodul aus den übermittelten Amplitudenwerten.
- 15 Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	Lichtquelle
	3	Mehrlinienlaser
5	5	Beleuchtungslichtstrahl
	7	Linse
	9	Optik
	11	Beleuchtungslochblende
	13	Strahlteiler
10	15	Scanspiegel
	17	Scanoptik
	19	Tubusoptik
	21	Objektiv
	23	Probe
15	25	Detektionslichtstrahl
	27	Detektionsblende
	29	Spektraldetektor
	31	Multibanddetektor
	33	Modul
20	35	Speichermodul
	37	Datenbusses
	39	Verarbeitungsmodul
	41	PC
	43	Monitor
25	45	Abrastern

47	Detektieren
49	Ermitteln
51	Übertragen
53	Rekonstruieren

Patentansprüche

1. Verfahren zur Scanmikroskopie gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - 5 • Beleuchten einer Probe, die zumindest einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, mit Beleuchtungslicht,
 - Detektieren des von Rasterpunkten der Probe ausgehenden Detektionslichtes mit einem Spektraldetektor, der für jeden Rasterpunkt Spektraldaten erzeugt,
 - 10 • Ermitteln eines Amplitudenwertes zu jedem Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten und
 - Übertragen der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchten ein Abrastern der Rasterpunkte der Probe mit Beleuchtungslicht umfasst.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Abrastern sequentiell erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Abrastern zumindest teilweise simultan erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das
20 Abrastern zeilenweise erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Spektraldetektor ein Gitter- oder Prismenspektrometer umfasst.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
25 gekennzeichnet, dass der Spektraldetektor einen Multibanddetektor umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

- Ermitteln des zumindest einen in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs aus den Spektraldaten.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Ermitteln des zumindest einen in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs ein Vergleichen der Spektraldaten mit in einem Speichermodul für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe abgelegten Referenzdaten umfasst.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt:

- Rekonstruieren der Spektraldaten in dem Verarbeitungsmodul aus den übermittelten Amplitudenwerten.

11. Scanmikroskop mit einer Lichtquelle, die Beleuchtungslicht zur Beleuchtung einer Probe emittiert, die zumindest einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, mit einer Scaneinrichtung zum Abrastern von Rasterpunkten der Probe, mit einem Spektraldetektor zum Detektieren des von den Rasterpunkten ausgehenden Detektionslichtes, wobei der Spektraldetektor für jeden Rasterpunkt Spektraldaten erzeugt, dadurch gekennzeichnet, dass ein Modul zum Ermitteln eines Amplitudenwertes für jeden Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten vorgesehen ist, und dass Mittel zum Übertragen der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul vorgesehen sind.

12. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Abrastern sequentiell erfolgt.

13. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Abrastern zumindest teilweise simultan erfolgt.

14. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Abrastern zeilenweise erfolgt.

15. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Spektraldetektor ein Gitter- oder Prismenspektrometer umfasst.

16. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Spektraldetektor ein Multibanddetektor umfasst.

17. Scanmikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der zumindest eine in der Probe enthaltene Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten ermittelbar ist.
18. Scanmikroskop nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass
5 ein Speichermodul vorgesehen ist und das Ermitteln des zumindest einen in der Probe enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs ein Vergleichen der Spektraldaten mit Referenzdaten umfasst, die in dem Speichermodul für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe ablegbar sind.
19. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch
10 gekennzeichnet, dass die Spektraldaten in dem Verarbeitungsmodul aus den übermittelten Amplitudenwerten rekonstruierbar sind.

Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Scanmikroskopie ist offenbart. Das Verfahren ist gekennzeichnet durch folgende Schritte das Beleuchten einer Probe, die zumindest einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, mit Beleuchtungslicht, des

5 Detektierens des von den Rasterpunkten ausgehenden Detektionslichtes mit einem Spektraldetektor, der für jeden Rasterpunkt Spektraldaten erzeugt, des Ermitteln eines Amplitudenwertes zu jedem Fluoreszenzfarbstoff aus den Spektraldaten und des Übertragens der Amplitudenwerte an ein Verarbeitungsmodul. Außerdem ist ein Scanmikroskop offenbart.

10 Fig. 1

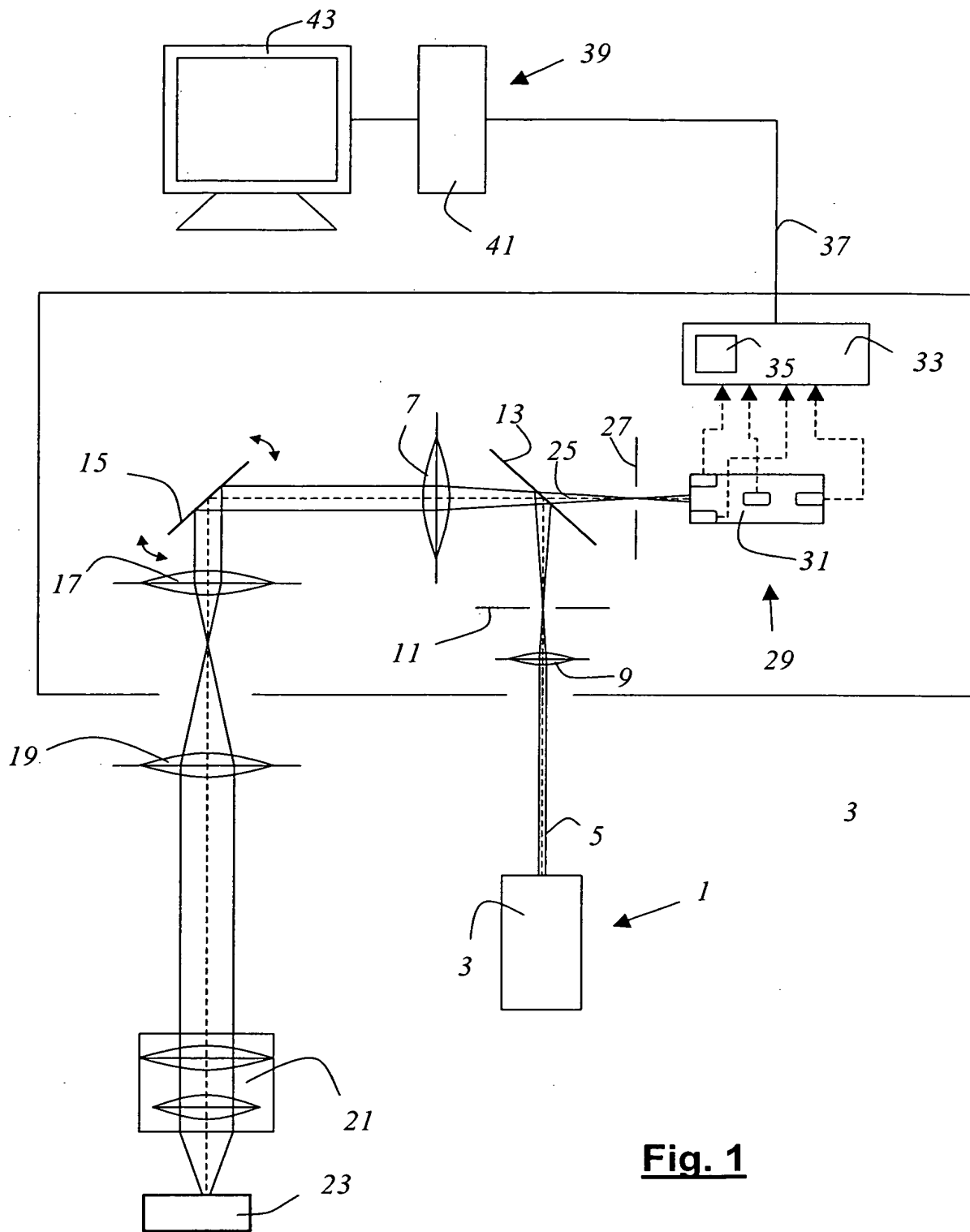


Fig. 1

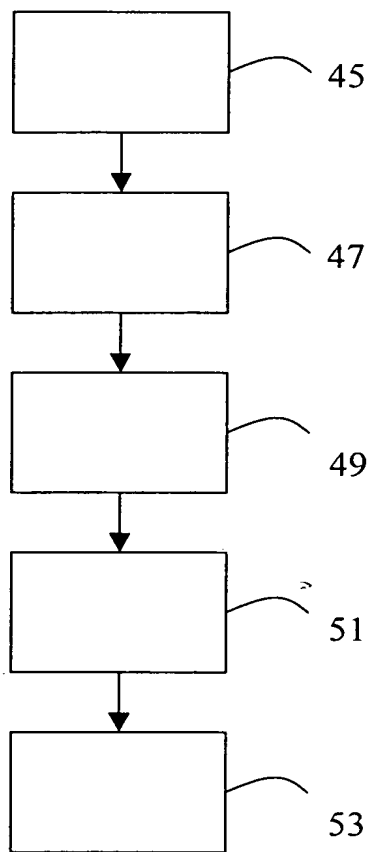


Fig. 2